

Determinazione turbidimetrica quantitativa della Transferrina nel siero o plasma

REF TB1123 R1: 2x25 mL + R2: 1x10 mL

PRINCIPIO DEL METODO

Anti Transferrina (TRF) umana (Anticorpo) è aggiunta a campioni contenenti TRF (Antigene). La reazione antigene anticorpo che si sviluppa determina la formazione di complessi insolubili che danno torbidità alla soluzione che incrementa la propria assorbanza a 340 nm. La misura di questo incremento è direttamente proporzionale alla quantità di TRF presente nel campione in esame. L'uso di una curva di calibrazione a valori noti consente di determinare le concentrazioni di TRF nei campioni incogniti.

SIGNIFICATO CLINICO

La Transferrina (TFR) è una proteina plasmatica che trasporta il ferro nel sangue. Sintetizzata dal fegato e dal sistema monocitico-macrofagico, la TFR è in grado di legare in modo molto stabile, ma reversibile, il ferro proveniente dalla degradazione dei globuli rossi e quello alimentare assorbito a livello intestinale. Dopo averlo legato a sé, la TFR lo trasporta alle sedi di utilizzo (in particolare al midollo osseo) e di deposito (in particolare al fegato). Il dosaggio della TFR nel sangue valuta la capacità di trasporto del ferro. Quest'esame viene spesso prescritto insieme alla Sideremia e alla Ferritina, laddove si sospettano anomalie del metabolismo del ferro.

Nel sangue, la TFR può trovarsi sia in forma libera - non legata al ferro (TFR insatura), sia in forma legata al ferro (TFR satura). La quota di quest'ultima coincide con il valore della Sideremia.

Nella pratica clinica, si dosa la Sideremia (quota di TFR circolante satura in ferro), la TFR, la Capacità Totale Ferro Legante o TIBC (misura indiretta della capacità della TFR di legare il ferro), la Saturazione della TFR (percentuale di TFR saturata dal Ferro).

Un aumento delle concentrazioni sieriche di TFR si verifica in tutte quelle situazioni che richiedono un aumentato fabbisogno di ferro, ad esempio in presenza di Emorragie (incluse quelle occulte), Anemie sideropeniche, durante la crescita e la gravidanza, negli stati iposiemici. I livelli di TFR possono aumentare in seguito all'uso di contraccettivi ormonali. Innalzamenti dei valori sono tipici anche nel terzo trimestre di gravidanza e in bambini tra i due e i dieci anni.

Una riduzione delle concentrazioni sieriche di TFR si verifica in caso di malnutrizione, cachessia e carenze proteiche, malattie epatiche (come cirrosi, epatite, insufficienza epatica) o renali (per la perdita di proteine con le urine), stati infiammatori acuti e cronici, emocromatosi, ripetute trasfusioni e nel sovraccarico marziale. La concentrazione di TFR nel plasma varia in modo inversamente proporzionale al livello delle riserve. Al contrario, la saturazione della TFR diminuisce nelle carenze di ferro e aumenta negli eccessi. È possibile osservare decrementi della TFR durante terapia con cloramfenicolo o ACTH.

Un'assenza quasi totale di TFR (< 10 mg/dL) è tipica di una malattia autosomica recessiva, estremamente rara, chiamata attransferrinemia.

COMPOSIZIONE REAGENTI

R1 (Tampone):

Tampone TRIS, pH 7,5	100 mmol/L
Cloruro di Sodio	150 mmol/L

R2 (Antisiero):

Tampone TRIS, pH 7,5	100 mmol/L
Cloruro di Sodio	150 mmol/L
Anticorpi anti TRF umano (da capra)	

PREPARAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI

Reagenti liquidi e pronti all'uso, stabili fino alla data di scadenza riportata, se conservati come riportato in etichetta e si evitano contaminazione, evaporazioni ed esposizione prolungata alla luce diretta. Non congelare i reagenti. Scartare il reagente se appaiono segni di deterioramento come presenza di particelle e torbidità oppure mancato recupero dei valori di sieri di controllo certificati oppure Assorbanza (Abs) Bianco Reagente a 340 nm > 0,300 in cuvette da 1 cm contro acqua.

Dopo l'apertura dei flaconi, si consiglia di prelevare il volume necessario, di richiudere immediatamente i flaconi e di riportarli in frigo al fine di evitare contaminazione, degradazione da luce diretta ed evaporazione.

Procedura Antisiero Start (Bi-Reagente):

I Reagenti R1 ed R2 sono liquidi e pronti all'uso.

Procedura Campione Start (Mono-Reagente):

Preparare una Soluzione di Lavoro con 5 parti di R1 + 1 parte di R2 (p. es. 10 mL di R1 + 2 mL di R2). Agitare delicatamente evitando la formazione di schiuma. Stabile: 6 mesi a 2-8°C, 5 giorni a 15-25°C, 30 giorni a bordo di strumenti con comparto refrigerato.

CAMPIONI

Siero fresco e privo di emolisi. Plasma da eparina o EDTA.

Evitare campioni emolisi o lipemici. Separare il siero dal coagulo rapidamente. Effettuare un solo scongelamento.

Stabilità: 1 giorno a 15-25°C ; 3 giorni a 2-8°C ; 1 mese a -20°C.

PROCEDURA

Lunghezza D'onda:	340 nm
Temperatura:	+37°C
Bianco:	acqua distillata

ANTISIERO START (BI-REAGENTE)

Pipettare come segue:

Reagente (R1)	700 µL
Campione / Calibratore /H ₂ O	6 µL

Miscelare and dopo 30" leggere l'Assorbanza (Abs1) e poi aggiungere:

Reagente (R2)	140 µL
---------------	--------

Miscelare, dopo altri 300" leggere di nuovo l'Assorbanza (Abs 2).

Calcolare il Δ Abs (Abs2 – Abs1) sia per campioni che per calibratori

CAMPIONE START (MONO-REAGENTE)

Pipettare come segue:

Soluzione Lavoro	700 µL
Campione / Calibratore/H ₂ O	5 µL

Miscelare, attendere 30", leggere l'Assorbanza Abs1 e dopo altri 300" leggere l'Assorbanza Abs2.

Calcolare il Δ Abs (Abs2 – Abs1) sia per campioni che per calibratori

CALIBRAZIONE

I risultati dipendono dalla accuratezza della calibrazione, dal corretto settaggio del test sullo strumento, dal giusto rapporto volumetrico reagente/campione e dalla corretta temperatura di analisi.

Utilizzare il seguente prodotto MTD Diagnostics:

Plasma Protein Multicalibrator REF TUC1030 (3x1 mL)

Diluire il calibratore in NaCl 9g/L (soluzione fisiologica) come segue:

Diluizione	1	2	3	4	5	6
CAL (µL)	--	10	25	50	75	100
NaCl 9 g/L (µL)	100	90	75	50	25	--
Fattore	0.0	0.1	0.25	0.5	0.75	1.0

Moltiplicare la concentrazione del Calibratore per il corrispondente fattore per ottenere la concentrazione dell'analita di ogni diluizione.

Per evitare le diluizioni manuali del calibratore, è possibile utilizzare

Plasma Protein Multicalibrator Set REF TUC1035 (5x1 mL)

un set di calibrazione composto da flaconi di calibratori pre diluiti, con esatto valore indicato in etichetta.

CALCOLO

La seduta analitica non può essere validata se il Δ Abs (Abs2 – Abs1) del Bianco Reagente è > 0,300 a 340 nm in cuvetta da 1 cm di cammino ottico contro acqua.

Calcolare per ogni campione in esame e per ogni calibratore il Δ Abs (Abs2 – Abs1). Costruire una curva di calibrazione (Δ Abs contro concentrazioni dei singoli calibratori) e su di essa riportare i valori del Δ Abs (Abs2 – Abs1) dei campioni in esame per ricavarne le concentrazioni. Per calcoli automatici (previsti dagli analizzatori automatici), il metodo di elaborazione dati consigliato è la Curva SPLINE ma altri metodi possono essere utilizzati (Punto-Punto, Logit-Log 4P, etc.).

Fattore di Conversione: mg/dL x 10 = mg/L ; mg/Lx0,1 = mg/dL

Conoscendo il valore della Sideremia, è possibile calcolare la percentuale di saturazione in Ferro della TRF:

$$\text{Saturazione \%} = [\text{Sideremia } (\mu\text{g/dL}) / (\text{TRF mg/dL} \times 1,42)] \times 100$$

CONTROLLO QUALITA'

Sieri di controllo normali e patologici a concentrazione nota, devono essere analizzati regolarmente in ogni seduta analitica.

Utilizzare i seguenti prodotti MTD Diagnostics:

Plasma Protein Control Level 1 REF: TUC1040 (3 x 1 mL)

Plasma Protein Control Level 2 REF: TUC1050 (3 x 1 mL)

Il range dei valori dei controlli deve essere valutato come una linea guida potendo esso essere determinato dall'applicazione del metodo o dalla manualità dell'utente o da altri fattori. I valori ottenuti devono essere utilizzati ai fini della valutazione della Precisione del metodo (Ripetibilità). Per la valutazione della Accuratezza del metodo (Riproducibilità) è necessario aderire ad un programma di Valutazione Esterna Qualita' (VEQ) gestito da enti certificati.

VALORI DI RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICI

Adulti TFR 200-360 mg/dL

Adulti Saturazione TFR 15 – 45 %

Ogni laboratorio dovrebbe stabilire un range di valori attesi in base alla propria popolazione di pazienti e, se necessario, determinare il proprio intervallo di riferimento. A fini diagnostici, i risultati devono sempre essere valutati insieme alla storia medica del paziente, all'esame clinico e ad altri risultati.

PRESTAZIONI

PRECISIONE:

Livello basso: Campioni= 20; Media = 304; D.S. = 5,82; CV = 1,91%

Livello alto: Campioni= 20; Media = 494; D.S. = 7,37; CV = 1,49%

ACCURATEZZA: Una comparazione tra questo metodo (x) ed un metodo certificato del commercio (y) ha dato la seguente correlazione:

$$y = 1,01x - 0,90 \quad \text{con } r = 0,998$$

SENSIBILITA': 3 mg/dL

LINEARITA': da 3 a 700 mg/dL.

INTERFERENZE E SPECIFICITA'

Non interferiscono: la Bilirubina fino a 20 mg/dL, l'Emoglobina fino a 1000 mg/dL, i Trigliceridi fino a 800 mg/dL. Altre sostanze possono interferire.

PRECAUZIONI

R1 e R2 contengono TRIS BUFFER 100 mmol/L, pH 7.5 - CAS 1185-53-1

H315: Provoca irritazione cutanea

H319: Provoca gravi irritazioni oculari

H335: Può irritare le vie respiratorie

L'anticorpo presente nel reagente è di origine animale e non è in grado di trasmettere malattie infettive all'uomo. Tuttavia, poiché non ci sono metodi per garantire la totale assenza di tali agenti infettivi o di altri microbi, questo prodotto deve essere maneggiato come se fosse rischioso e potenzialmente in grado di trasmettere malattie infettive di qualsiasi tipo, in conformità con gli standard della Buona Pratica di Laboratorio.

Il prodotto non contiene altre sostanze o miscele pericolose secondo la regolamentazione CE n° 1272/2008 ovvero le loro concentrazioni sono tali da non essere considerate persistenti, bioaccumulanti o tossiche (PBT). Il prodotto non è soggetto ad etichettatura secondo le direttive CE o le corrispondenti normative nazionali. Sodio Azide inferiore a 0.1%.

Tuttavia, in osservanza alle normali norme di prudenza che ognuno deve osservare allorchè maneggi qualunque sostanza chimica o reagente di laboratorio, in caso di contatto dei Reagenti con l'operatore, occorre applicare i seguenti interventi di primo soccorso:

S26 (P305 – P351 – P338): In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare il medico.

S28 (P302 – P352): In caso di contatto con la pelle, lavarsi immediatamente ed abbondantemente.

S36/37/39 (P280): Usare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi/la faccia.

S46 (P301 – P310): In caso d'ingestione consultare immediatamente il medico e mostrargli il contenitore o l'etichetta. Se la vittima è cosciente, lavare la bocca con acqua.








S56 (P273): Smaltire questo materiale e relativi contenitori in un punto di raccolta autorizzato per rifiuti pericolosi o speciali.

S63 (P304 – P340): In caso di incidente per inalazione, allontanare l'infortunato dalla zona contaminata e mantenerlo a riposo.

Tutti i campioni in esame, calibratori e controlli devono essere trattati come materiale potenzialmente infettivo capace di trasmettere HIV ed epatiti.

PER OGNI ALTRA INDICAZIONE, RICHIEDERE LA SCHEDA DI SICUREZZA AL PRODUTTORE.

SIMBOLOGIA

	Marchio CE (prodotto conforme ai requisiti della Dir. 98/79 CE)		
	Dispositivo medico diagnostico in vitro		Limiti temperatura di conservazione
	Consultare le istruzioni per l'uso		Dimensione / numero test
REF	Numero di catalogo		Scadenza
LOT	Numero di lotto		Fabbricante

BIBLIOGRAFIA

Narayanan S. *Clin.Chem* 128: 1528-1531 (1982)

Stevens, C.D. *Clinical immunology and serology: a laboratory perspective*. 3rd. Edition. FA Davis Company. (2010)

Price CP et al. *Ann Clin.Biochem* 20: 1-14 (1983)

Dati F et al. *Eur J Clin.Chem. Clin. Biochem.* 34 : 517-520 (1996)